



TITLE:

低分子薬物の徐放化を目指した生体吸収性ハイドロゲルのデザインと調製

AUTHOR(S):

田畑, 泰彦; 谷郷, 智美; 高岡, 良平

CITATION:

田畑, 泰彦 ...[et al]. 低分子薬物の徐放化を目指した生体吸収性ハイドロゲルのデザインと調製. 日本化学繊維研究所講演集 2010, 67: 95-107

ISSUE DATE:

2010-03

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/153367>

RIGHT:

日本化学繊維研究所

低分子薬物の徐放化を目指した生体吸収性ハイドロゲルのデザインと調製

田畑 泰彦、谷郷 智美、高岡 良平

Yasuhiko Tabata, Tomomi Tanigo, Ryohei Takaoka

京都大学再生医科学研究所 生体材料学分野

1. はじめに

細胞の増殖と分化能力を介した体のもつ自然治癒力によって、欠損されたあるいは機能低下した生体組織の再生修復をねらう新しい治療の試みが進められている。この再生誘導治療（一般には再生医療と呼ばれている）には、2つのアプローチがある。1つ目は、細胞移植法である。増殖、分化能力の高い幹細胞や前駆細胞を移植することによって、細胞力を利用して生体組織の再生修復を実現する。もうひとつが、体内で用いる材料に関するバイオマテリアル(生体材料)を用いて、体内に存在する細胞の能力を増強させる生体組織工学アプローチである。

体は、基本的に2つのもので構成されている(図1)。それは細胞とその周辺環境である¹。周辺環境は、細胞の増殖分化を与えるための3次元構造物である細胞外マトリックス(天然の足場)と細胞の増殖分化を促すための細胞増殖因子とからなっている。いかに細胞の能力が高くても、その能力を最大限に発揮させるための周辺環境が整っていなければ、細胞力を活用した生体組織の再生誘導治療は実現できない。近年、細胞の生物医学研究の進歩によって、細胞外マトリックスや細胞増殖因子に対する基礎的知見が集積されるとともに、バイオマテリアル技術も大きく発展している。これらの研究成果をもとにして、細胞の周辺環境を人工的に作り、細胞の増殖分化を促すことによって、生体組織の再生修復が可能となっている²⁻⁵。本稿では、細胞増殖因子を利用した生体組織の再生誘導について述べる。

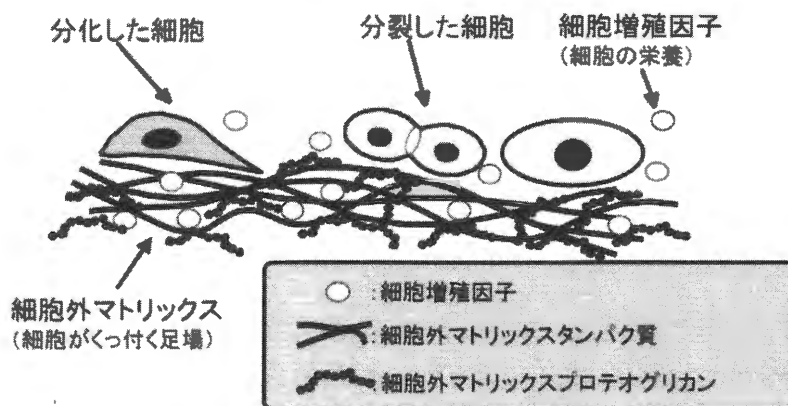


図1. 生体組織を構成している要素

細胞増殖因子は、タンパク質であり、一般に、体内では酵素分解を受けやすく、その生体寿命は短く、不安定である。そのため、細胞増殖因子を水溶液のまま体内に投与するだけでは、その生物活性は期待できない。この問題を解決するための技術、方法論がドラッグデリバリーシステム(DDS)である。DDSの目的は、生理活性をもつ物質であるドラッグ(薬物)とバイオマテリアルとを組み合わせることによって薬物の生物活性を最大限に高めることである(図2)⁶。このDDS技術を用いることで、体内における細胞増殖因子の生物活性を高め、その結果、細胞の増殖分化が促され、生体組織の再生修復が可能となってきた^{2-5,7}。例えば、骨組織の作る能力をもつ骨芽細胞の能力を高め、骨組織の再生修復を高めるタンパク質として、骨形成因子(bone morphogenic protein, BMP)-2が知られている⁸。しかしながら、体内で不安定なBMP-2を水溶液として体内に投与するだけでは、その骨再生能力は必ずしも発揮されない。そこで、BMP-2の生物活性を高めるためのDDS工夫を行った。すなわち、生体吸収性高分子からなるハイドロゲルを作製、それと組み合わせることでBMP-2を徐放化させた。その結果、BMP-2の再生誘導力が高まり、骨組織の再生修復が認められた⁹。これらの結果は、細胞増殖因子のDDS化が再生誘導治療の有力な方法論となることを示している。

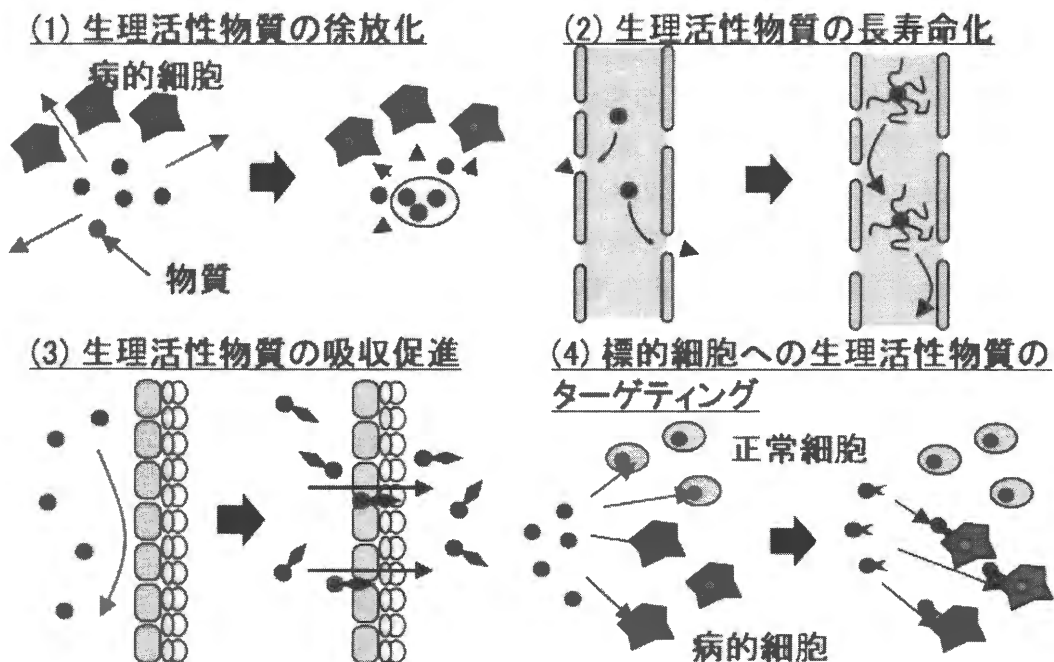


図2. ドラッグデリバリーシステムの4つの技術

近年の薬物開発の1つのトピックは、投与方法を変更することで新しい薬物の薬理活性を見出すことである。これまで、高脂血症治療薬として用いられてきたシンバスタチンが、骨形成増強作用のあることが知られている¹⁰。しかしながら、この生物活性を効率よく体内で発揮させるためには、DDS的な工夫が必要となる。例えば、ポリ乳酸からなる徐放キャリアを用いて、スタチンを徐放することによってその骨再生活性が高まることが報告された¹¹。しかしながら、ポリ乳酸の材料自身の炎症反応惹起性に改良の余地があり、より体にやさしい徐放キャリアの研究開発が望まれている。本研究では、疎水性高分子であるポリ乳酸に比べて、炎症惹起性の低い生体吸収性ハイドロゲルを利用して、難水溶性で低分子薬物であるシンバスタチンを徐放化することを試みた(図3)。

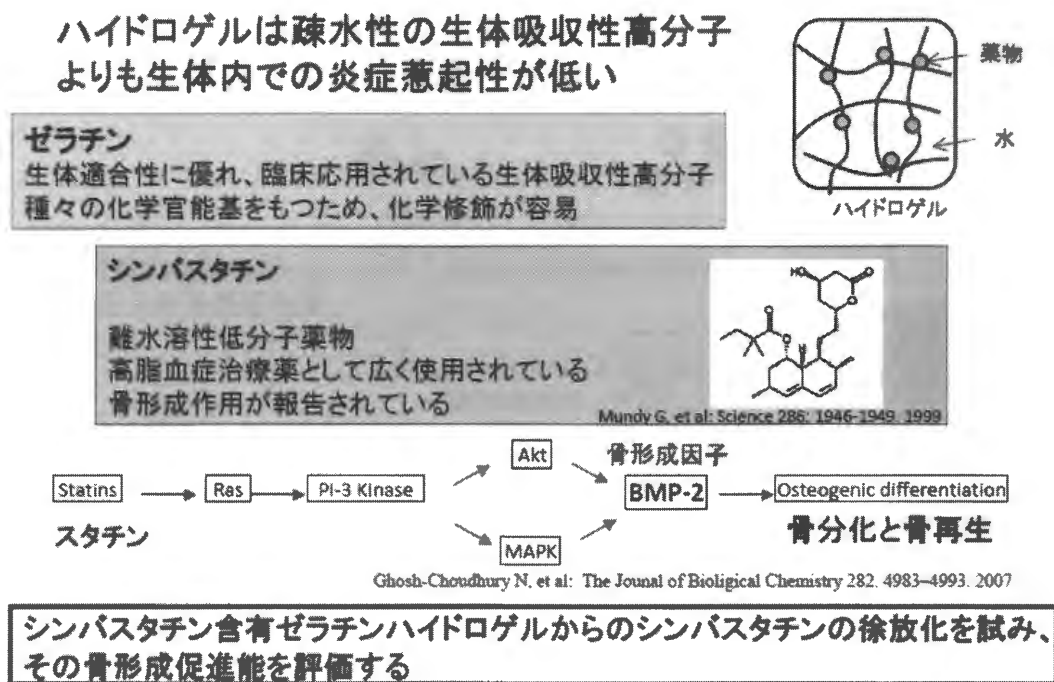


図3. 生体吸収性ハイドロゲルからの難水溶性低分子薬物シンバスタチンの徐放化

2. 実験

実験概要を図4に示す。難水溶性低分子薬物であるシンバスタチンをハイドロゲル内に均一に組み込ませる(含有)ためには、まず、薬物を水可溶化させることが必要となる。そのため、生体適合性に優れ、すでに臨床応用されている生体吸収性高分子であるゼラチンと乳酸オリゴマーを選んだ。乳酸オリゴマーをグラフト反応させることでミセル形成能をもつ乳酸オリゴマーグラフトゼラチンを作製した。この乳酸オリゴマーグラフトゼラチン

によってシンバスタチンを水可溶化した。次に、水可溶化シンバスタチンを含むゼラチン水溶液からハイドロゲルを調製、スタチン含有ゼラチンハイドロゲルを得た。この徐放システムでは、ハイドロゲル内に含有固定化された水可溶化スタチンは、ハイドロゲルの分解とともに、ハイドロゲルから徐放化される。

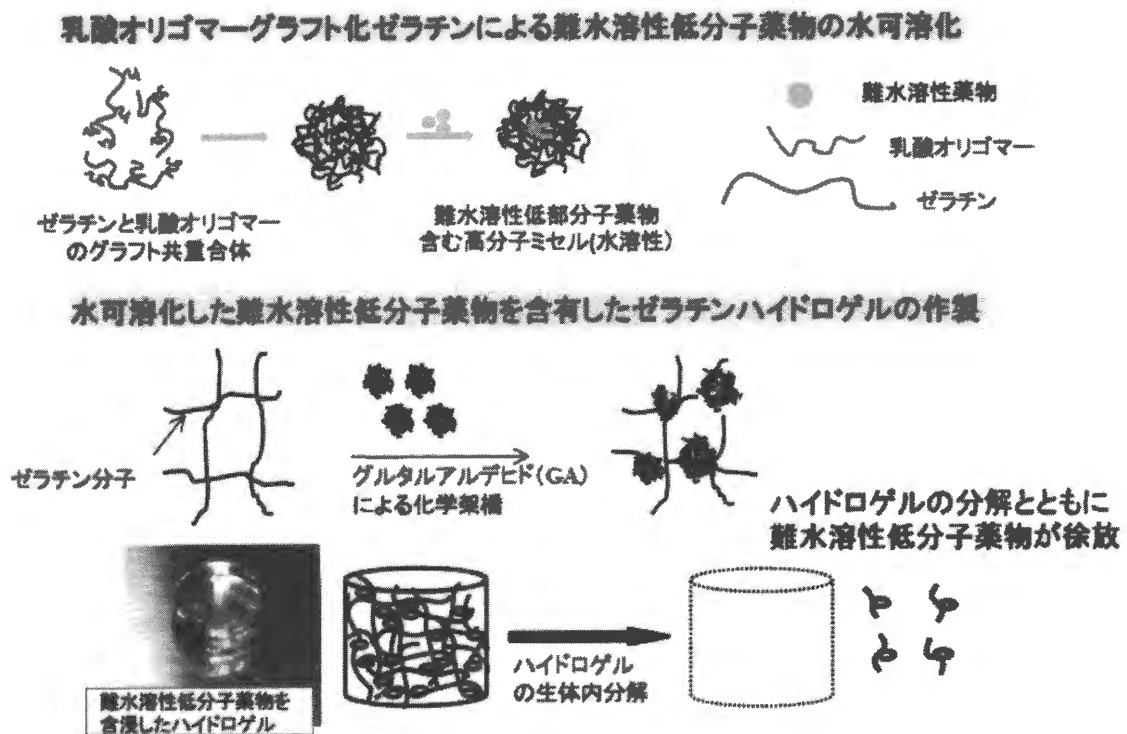


図 4. 難水溶性低分子薬物を徐放化できる生体吸収性ハイドロゲルの作製プロセス

2-1. 乳酸オリゴマーグラフトゼラチンの作製

牛骨由来、等電点 5.0 のゼラチン (1 g, 1.0×10^{-5} モル、平均重量分子量: 100,000、新田ゼラチン株式会社より供与) を脱水ジメチルスルホキシド (DMSO) 30 ml 中に溶解させた。一方、異なる量 (3.0, 7.5, および 15×10^{-5} モル) の乳酸オリゴマー (重量平均分子量: 1,000, 5,000, および 20,000) を 15 ml の DMSO へ溶解させた。次に、乳酸オリゴマー末端の OH 基の 3 倍モル量の N,N-ジスクシイミジルカーボネート および触媒 4-ジメチルアミノピリジンを加え、3 時間反応させ、乳酸オリゴマーの OH 基を活性化させた。ゼラチン溶液と活性化乳酸オリゴマーとを混合、室温、一晩の条件で乳酸オリゴマーをゼラチン分子のアミノ基にグラフト反応させた。この反応溶液を蒸留水に対して透析、凍結乾燥することで乳酸オリゴマーグラフトゼラ

チンを得た。

2-2. 乳酸オリゴマーグラフトゼラチンのキャラクタリゼーション

乳酸オリゴマーのゼラチンへの導入率は、グラフト反応によるゼラチンのアミノ基の減少量をフルオレスカミンで測定することで算出した^{12,13}。異なる濃度のβ-アラニン水溶液を用いて標準曲線を作成した。

乳酸オリゴマーグラフトゼラチンの臨界ミセル濃度 (CMC) は蛍光物質ピレンを用いた蛍光強度測定にて算出した¹⁴。異なる濃度 (0.001 から 1 mg/ml) の乳酸オリゴマーグラフトゼラチンの 10 mM リン酸緩衝生理食塩水溶液 (PBS, pH 7.4) へ 6 mM ピレンのアセトン溶液を混合した。混合液の励起波長 333 および 339 nm に対する 390 nm の蛍光強度 (I_{333} および I_{339}) を測定した。それぞれの乳酸オリゴマーグラフトゼラチン濃度に対する蛍光強度比 (I_{339}/I_{333}) をプロットし、蛍光強度比が急激に変化する際の乳酸オリゴマーグラフトゼラチン濃度を CMC とした。

2-3. 乳酸オリゴマーグラフトゼラチンによる難水溶性薬物の水可溶化評価

乳酸オリゴマーグラフトゼラチン (1 mg/ml) およびシンバスタチン (0.6 あるいは 1.0 mg/ml) の DMSO 溶液をそれぞれ調製した。シンバスタチン溶液 (15 ml) を乳酸オリゴマーグラフトゼラチン溶液 (30 ml) へ加え、室温下で 3 時間、攪拌した。反応溶液を蒸留水に対して 72 時間、透析した。得られた透析液を、8,000 rpm, 4°C, 10 分の条件で、水可溶化していないシンバスタチンを遠心除去した。上清を凍結乾燥することにより、水可溶化スタチン (スタチン内包ミセル) を得た。水可溶化スタチンを 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFP) に溶解、溶解液の 248 nm の吸光度を測定した。既知濃度のシンバスタチンを用いて標準曲線を作成、乳酸オリゴマーグラフトゼラチンによるシンバスタチンの水可溶化量を算出した。

2-4. 水可溶化スタチンの *in vitro* 骨再生活性の評価

マウス由来骨芽様細胞である MC3T3-E1 細胞を 2×10^4 cells/cm² の密度で 24 ウェルプレートへ播種、10 vol% 仔ウシ胎児血清を含む α-Minimum Essential Medium (αMEM-FCS) にて、5% CO₂-95% Air, 37°C で培養した。72 時間後、10 mM β-グリセロリン酸および 2 mM L-アスコルビン酸を含む αMEM-FCS に培養液交換した。シンバスタチンを含まない空ミセル、0.4 μg シンバスタチンエタノール溶液、および 0.4 μg シンバスタチンを含むスタチン内包ミセルを培養液に加えた。1, 2, 3, および 4 週間後の培養液を回収し、培養液中に含まれる BMP-2 量を酵素結合免疫吸着法にて測定した。

2-5. スタチン含有ゼラチンハイドロゲルの作製

豚皮由来、等電点 9.0 のゼラチン(50 mg/ml, 100 μ l)とスタチン内包ミセル溶液(50 mg/ml, 100 μ l)とを混合した。得られた混合液へ種々の濃度のグルタルアルデヒド(GA、0.50, 0.25, 0.13, および 0.063 vol%)を加え、10 mm \times 10 mm のポリスチレンディッシュへ流延、4 $^{\circ}$ C、12 時間の条件でゼラチンを化学架橋した。その後、100 mM のグリシン溶液を加え、37 $^{\circ}$ C、1 時間の条件で反応、GA のアルデヒド基をブロックした。蒸留水による洗浄(1 時間)を 3 回行い、凍結乾燥することによりスタチン含有ゼラチンハイドロゲルを得た。

2-6. スタチン含有ゼラチンハイドロゲルからのスタチン徐放性とハイドロゲル分解性の評価

スタチン含有ゼラチンハイドロゲルを 1 ml の 10 mM リン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH7.4)あるいは 373 ng/ml コラゲナーゼを含む PBS へ投入した。スタチン徐放試験は 37 $^{\circ}$ C 中で行い、所定時間ごとに PBS を交換した。回収した PBS を凍結乾燥後、HFP で溶解、前述のようにシンバスタチン量を測定した。ハイドロゲル分解試験においては、所定時間後回収した PBS の 280 nm の吸光度を測定した。既知濃度のゼラチンを用いて標準曲線を作成、ハイドロゲル分解にともない水可溶化したゼラチン量を算出した。

2-7. スタチン含有ゼラチンハイドロゲルの *in vivo* 骨再生誘導能の評価

ゼラチンハイドロゲル、空ミセル含有ゼラチンハイドロゲル、異なる量のシンバスタチンを含むスタチン含有ゼラチンハイドロゲルをウサギ抜歯部位に埋入した。5 週間後にウサギを犠牲死させ、軟 X 線写真撮影およびヘマトキシリン・エオジン染色された組織切片より再生骨組織の定量を行った。

3. 結果と考察

3-1. 乳酸オリゴマーグラフトゼラチンの作製とキャラクターゼーション

乳酸オリゴマーの分子量に関係なく、グラフト反応時の乳酸オリゴマーの仕込み量を変化させることで、乳酸オリゴマーのゼラチンへの導入率を変化させることが可能であった(図 5)。得られた乳酸オリゴマーグラフトゼラチンは、CMC を示し、それ自身にミセル形成能をもつことがわかった。これは、親水性のゼラチン分子に疎水性の乳酸オリゴマーフラグメントが導入されることによって、界面活性能をもつ乳酸オリゴマーグラフトゼラチンが得られたことを示している。

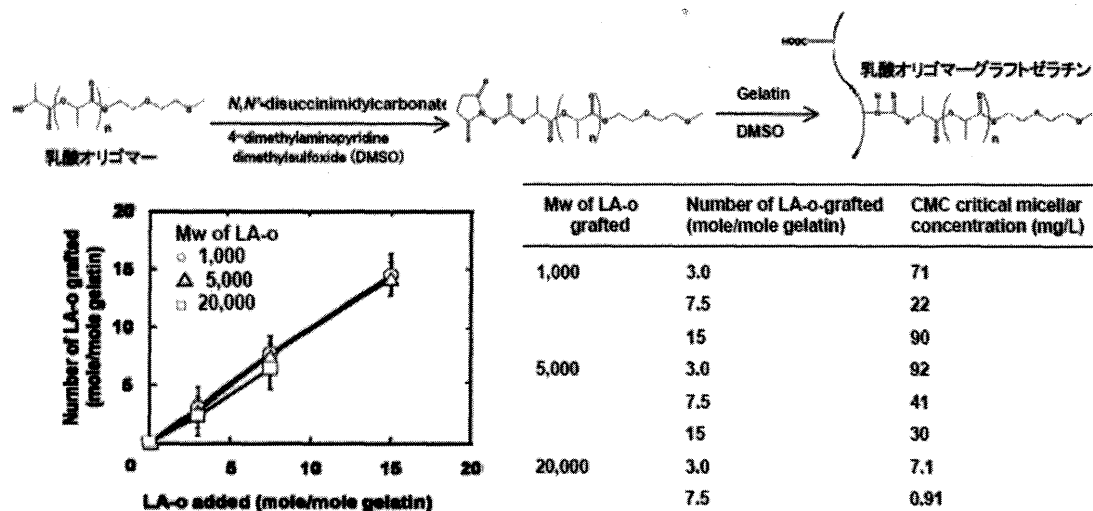


図 5. 乳酸オリゴマーグラフトゼラチンの作製とキャラクタリゼーション

3-2. 乳酸オリゴマーグラフトゼラチンによるスタチンの水可溶化と in vitro 骨再生活性

図 6 は乳酸オリゴマーグラフトゼラチンによる難水溶性薬物スタチンの水可溶化率を示す。図から明らかなように、乳酸オリゴマーの分子量によらず、いずれのオリゴマーグラフトゼラチンもスタチンを水可溶化することができた。また、分子量 1000 の乳酸オリゴマーのミセルが最も高いスタチン水可溶化能をもっていた。これらの結果は、CMC をもつ乳酸オリゴマーグラフトゼラチンのミセル中に、難水溶性薬物であるシンバスタチンが内包されたことを示している。乳酸オリゴマーの分子量によるスタチンの水可溶化能の違いは、スタチンの分子サイズや疎水性度と乳酸オリゴマーグラフトゼラチンミセル内で形成される疎水性領域のサイズや疎水性度とのバランスによって説明できると考えられる。

図 7 は乳酸オリゴマーグラフトゼラチンによる水可溶化スタチン（スタチン内包ミセル）の in vitro 骨再生活性評価の結果である。乳酸オリゴマーグラフトゼラチンによる水可溶化スタチンは BMP-2 の産生誘導活性（骨再生活性）をもっていることがわかった。この結果は、ミセル内に内包され水可溶化したシンバスタチンは、本来の生物活性を保持していることを示している。スタチン内包ミセルの生物活性が、細胞培養 2 週間目においても有意に高い理由に関しては、現在よくわかっていないが、ミセル内包により、その培養液中での安定性が改善されたこと、あるいはミセルからのスタチンの徐放化が達成され、その結果として、細胞への作用が延長されたことなどが考えられる。

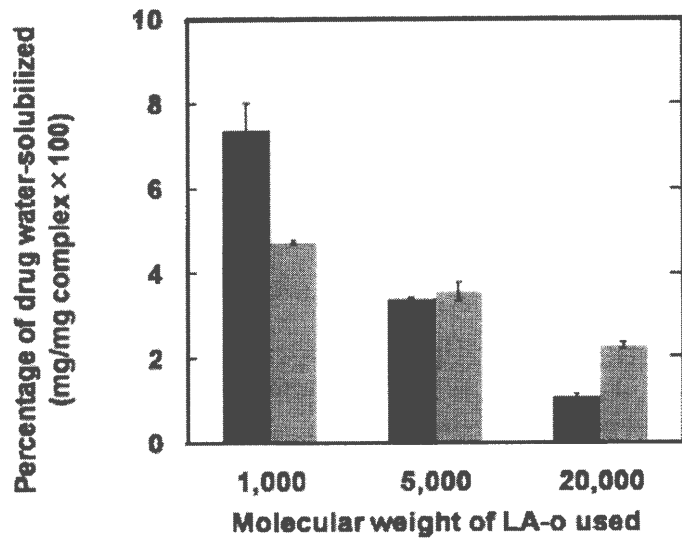


図 6. 乳酸オリゴマーグラフトゼラチンによる難水溶性薬物スタチンの水可溶化率。仕込みシンバスタチン濃度は、0.6 (■) あるいは 1.0 mg/ml (▨) である。

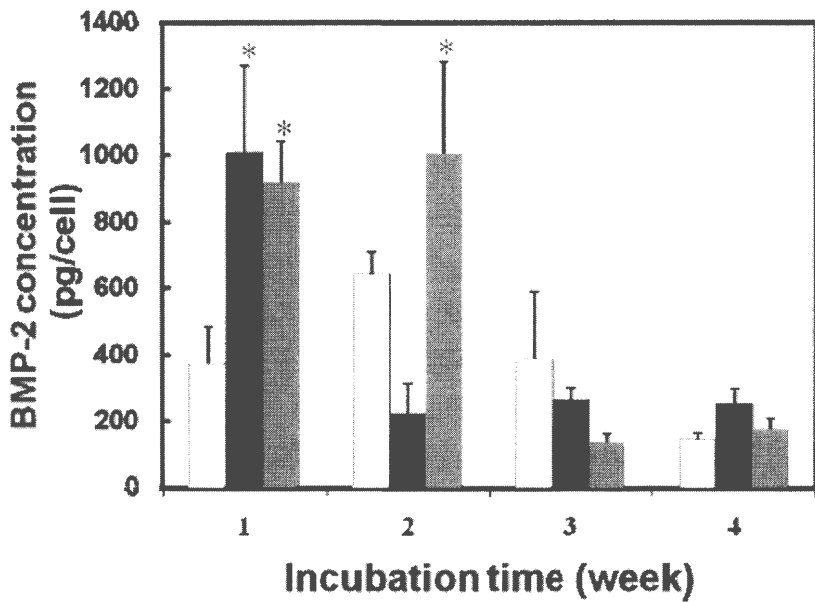


図 7. 乳酸オリゴマーグラフトゼラチンによる水可溶化スタチンの in vitro 骨再生活性評価。MC3T3-E1 細胞を空ミセル (□)、スタチンエタノール溶液 (■)、スタチン内包ミセル (▨) を含む培養液中で培養した。

*, $p < 0.05$ 空ミセル添加群に対して有意差あり。

3-3. スタチン含有ゼラチンハイドロゲルからのスタチンの徐放とハイドロゲルの分解

図 8 はスタチン含有ハイドロゲルからのスタチンの徐放性とハイドロゲルの分解性の結果である。コラゲナーゼを含む水溶液中では、スタチン含有ゼラチンハイドロゲルからのスタチンの徐放が認められた。その徐放プロフィールは、ハイドロゲル作製時の GA 濃度によって変化した。すなわち、GA 濃度の増加とともに、スタチン徐放は抑制された。一方、コラゲナーゼを含まない水溶液中では、最低の GA 濃度で作製されたハイドロゲル以外では、スタチンの徐放が見られなかった。ハイドロゲルの分解性を調べたところ、コラゲナーゼを含む水溶液中でのみハイドロゲルの分解が見られた。スタチン含有ゼラチンハイドロゲルからのスタチン徐放の半減期をハイドロゲルの分解の半減期に対してプロットした (図 8D) ところ、両者の間にはよい相関性が認められた。

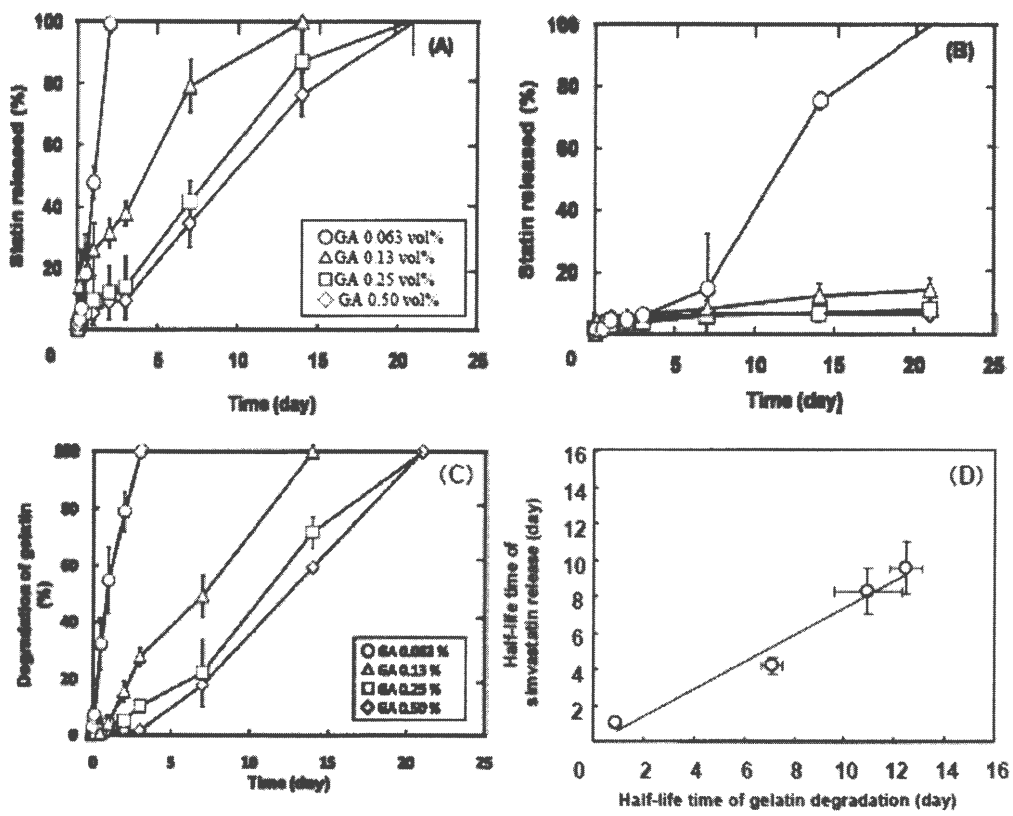


図 8. スタチン含有ゼラチンハイドロゲルからのスタチンの徐放性(A,B)とハイドロゲル分解性(C)。コラゲナーゼを含む(A,C)あるいは含まない PBS(B)で試験を行った。(D)スタチン徐放とハイドロゲル分解の相関。

スタチン含有ゼラチンハイドロゲルの作製条件から考えて、ハイドロゲル内では、水可溶化スタチンはゼラチンマトリクス内に取り込まれているであろう。一方、ゼラチンは GA により化学架橋されているため、ゼラチン分子がコラゲナーゼのような酵素にて分解、ゼラチンが水可溶化されない限り、ゼラチンマトリクス内に取り込まれたミセル内包水可溶化スタチンは、ハイドロゲルから放出されないと考えられる。そのため、コラゲナーゼ存在下でのみ、スタチンの徐放が見られ、しかも、その徐放化パターンは、GA 濃度、すなわちハイドロゲル内でのゼラチンの架橋程度に依存する。一方、ハイドロゲルの分解もゼラチンの架橋程度に依存することがわかっている。これらの結果、ハイドロゲルからのスタチンの徐放パターンが、ハイドロゲルの分解パターンとよく相関するようになったと考えられる。これらの徐放キャリアとしてのハイドロゲルの分解にともなう、ハイドロゲル含有薬物の徐放化メカニズムは、すでに種々の細胞増殖因子で確認されている^{4,15-18}。最低濃度の GA で作製されたハイドロゲルからコラゲナーゼのない水溶液中でスタチンが徐放された。この理由としては、架橋度が低く、ハイドロゲル内のゼラチンの水可溶性画分が多く、ハイドロゲルが分解されていない条件においても、水可溶化スタチンがハイドロゲル内から拡散によって放出されたことが考えられる。

3-4. スタチン含有ゼラチンハイドロゲルの *in vivo* 骨再生誘導能

図 9 はスタチン含有ゼラチンハイドロゲルの *in vivo* 骨再生誘導能の評価の結果である。スタチン含有ゼラチンハイドロゲルを骨欠損部へ埋入したところ、骨組織の再生修復が X 線的に確認された(図 9A)。しかしながら、ゼラチンハイドロゲルあるいはスタチンを含まない空ミセルを含有したゼラチンハイドロゲル埋入群では、骨再生は見られなかった。組織学的評価(図 9B)においても、同様の結果が得られ、スタチン含有ゼラチンハイドロゲル埋入群において、他のコントロール群に比べて、有意に高い骨誘導能が認められた。このように有意に骨再生が認められた理由として、以下のようなことが考えられる。スタチン含有ゼラチンハイドロゲルが骨欠損部で、徐々に酵素分解をうける。その結果として、骨欠損部の局所で生物活性をもつスタチンが徐放化される。徐放化されたスタチンは、欠損部周辺に存在している細胞に作用、細胞から BMP-2 を分泌、その結果として骨の再生誘導が得られた。これらの知見は、従来、別の治療のために使われてきた薬物を DDS 化し、局所でうまく徐放化することで、これまでにない薬理作用が実現できることを示している。加えて、本研究は難水溶性薬物を水分を多量に含むハイドロゲルから徐放化させることが可能であり、その徐放パターンをハイドロゲルの架橋程度によりコントロールできることを実証している。このよう

な徐放化システムの報告は世界で初めての報告である。

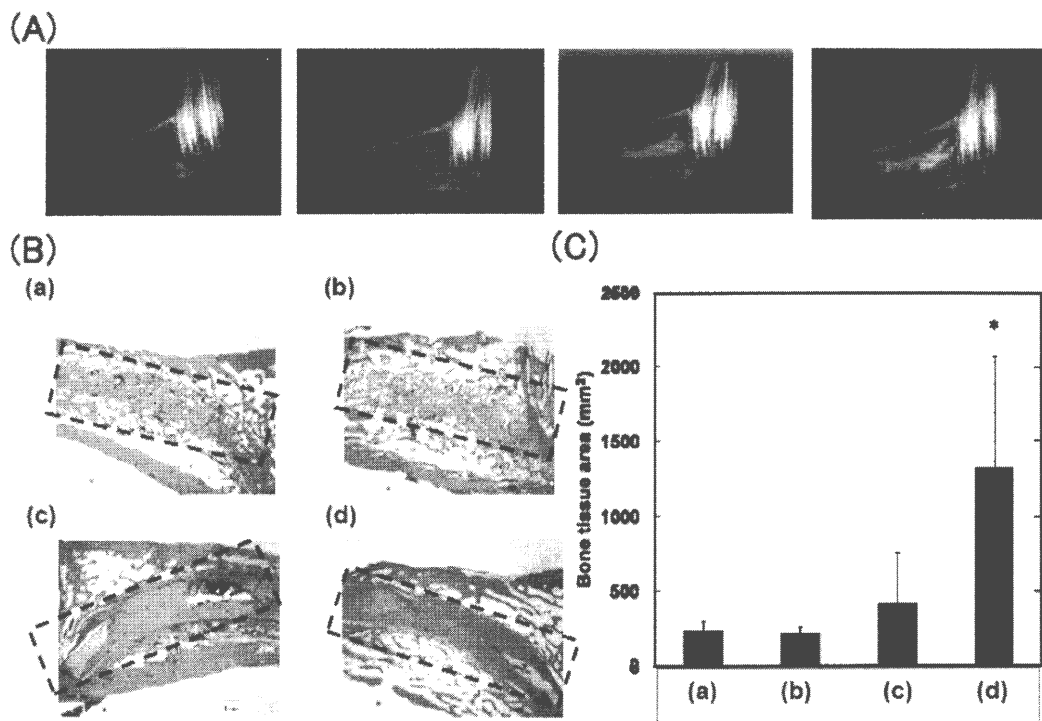


図 9. スタチン含有ゼラチンハイドロゲルの in vivo 骨誘導能の評価。(A)軟 X 線画像、(B)HE 染色画像、および(C)再生骨組織面積。(a)ゼラチンハイドロゲル、(b)空ミセル含有ゼラチンハイドロゲル、(c)スタチン含有ゼラチンハイドロゲル(1 μ g)、および(d)スタチン含有ゼラチンハイドロゲル(10 μ g)を抜歯部位へ埋入した。点線囲いが再生骨組織である。*, $p < 0.05$ 他の群に対して有意差あり。

4. 結言

体内に存在している細胞に DDS 技術を活用してうまく細胞増殖因子を作用させることによって、体内に備わっている自然治癒力を効率よく高め、結果として病気を治すことが可能になってきている^{2-5,7}。この DDS 技術を活用した再生誘導治療の実現には、生体吸収性のハイドロゲルが重要な役割を果たしている。再生医療というと高分子科学とはきわめて遠い存在であると考えられがちである。それは、再生医療＝細胞移植という固定観念があることが大きな理由である。冒頭でも述べたが、細胞の増殖分化能力を最大限に高めるためには、細胞がうまく働くための周辺環境の構築が必要不可欠である。この周辺環境は、細胞の生物医学研究の最新の知見と DDS を含むバイオマテリアル技術とをうまく組み合わせることでのみ作ることができる。本研究

の結果は、その具体例の1つである。生体吸収性ハイドロゲルを利用した徐放化は、種々の薬物に適用できる普遍性の高い高分子科学技術である。高分子科学技術の再生誘導治療における重要な位置付けを今一度、考えていただきたい。

5. 引用文献

- 1 田畑泰彦編集. ますます重要になる細胞周辺環境(細胞ニッチ)の最新科学技術. 株式会社メディカルドゥ: 大阪, 2009.
- 2 田畑泰彦編集. 再生医療のためのバイオマテリアル. コロナ社: 東京, 2006.
- 3 Yamamoto M, Tabata Y. Tissue engineering by modulated gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; **58**: 535-554.
- 4 Tabata Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *J.R.Soc.Interface* 2009; **6**: 311-324.
- 5 田畑泰彦編集. 患者まで届いている再生誘導治療. 株式会社メディカル・ドゥ, 2009.
- 6 田畑泰彦編集. ドラッグデリバリーシステムDDS技術の新たな展開とその活用法. メディカルドゥ社出版, 2003.
- 7 松本邦夫, 田畑泰彦編集. 細胞増殖因子と再生医療. メディカルレビュー社: 大阪, 2006.
- 8 Urist MR, Mikulski A, Lietze A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; **76**: 1828-1832.
- 9 Yamamoto M, Takahashi Y, Tabata Y. Enhanced bone regeneration at a segmental bone defect by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from a biodegradable hydrogel. *Tissue Eng* 2006; **12**: 1305-1311.
- 10 Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 1999; **286**: 1946-1949.
- 11 Benoit DS, Nuttelman CR, Collins SD, Anseth KS. Synthesis and characterization of a fluvastatin-releasing hydrogel delivery system to modulate hMSC differentiation and function for bone regeneration. *Biomaterials* 2006; **27**: 6102-6110.
- 12 Yoon JJ, Song SH, Lee DS, Park TG. Immobilization of cell adhesive RGD peptide onto the surface of highly porous biodegradable polymer scaffolds fabricated by a gas foaming/salt leaching method. *Biomaterials* 2004; **25**: 5613-5620.
- 13 Dash PR, Read ML, Fisher KD, Howard KA, Wolfert M, Oupicky D et al.

- Decreased binding to proteins and cells of polymeric gene delivery vectors surface modified with a multivalent hydrophilic polymer and retargeting through attachment of transferrin. *J Biol Chem* 2000; **275**: 3793-3802.
- 14 Lee ES, Oh KT, Kim D, Youn YS, Bae YH. Tumor pH-responsive flower-like micelles of poly(L-lactic acid)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly(L-histidine). *J Control Release* 2007; **123**: 19-26.
- 15 Tabata Y, Hijikata S, Muniruzzaman M, Ikada Y. Neovascularization effect of biodegradable gelatin microspheres incorporating basic fibroblast growth factor. *J Biomater Sci Polym Ed* 1999; **10**: 79-94.
- 16 Tabata Y, Miyao M, Inamoto T, Ishii T, Hirano Y, Yamaoki Y et al. De novo formation of adipose tissue by controlled release of basic fibroblast growth factor. *Tissue Eng* 2000; **6**: 279-289.
- 17 Ikada Y, Tabata Y. Protein release from gelatin matrices. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; **31**: 287-301.
- 18 Tabata Y. Current status of regenerative medical therapy based on drug delivery technology. *Reproductive BioMedicine Online* 2008; **16**: 70-80.